



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Intestinal clostridiosis hos vuxna hästar

Johanna Fridolf

Självständigt arbete i veterinärmedicin, 15 hp

Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2014: 10

Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Uppsala 2014



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Intestinal clostridiosis hos vuxna hästar

Intestinal clostridiosis in adult horses

Johanna Fridolf

Handledare:

Martin Wierup, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Examinator:

Eva Tydén, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Omfattning: 15 hp

Kurstitel: Självständigt arbete i veterinärmedicin

Kurskod: EX0700

Program: Veterinärprogrammet

Nivå: Grund, G2E

Utgivningsort: SLU Uppsala

Utgivningsår: 2014

Omslagsbild: -

Serienamn, delnr: Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2014: 10
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, SLU

On-line publicering: <http://epsilon.slu.se>

Nyckelord: Häst, ekvin, *Clostridium*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, patogenes, *Clostridium perfringens* typ A, enterokolit, akut, infektionen, diarré

Key words: Horse, equine, *Clostridium*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium perfringens* type A, pathogenesis, enterocolit, acute, infection, diarrhoea

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning	1
Summary	2
Inledning.....	3
Material och metoder.....	3
Historik.....	3
Clostridium.....	4
Etiologi	5
Klinisk bild	6
Epidemiologi	6
Diagnostik	6
Differentialdiagnoser.....	8
Patogenes.....	8
Riskfaktorer	11
Behandling	12
Diskussion	12
Referenser.....	15

SAMMANFATTNING

Intestinal clostridiosis, som bröts ut från det gamla begreppet ”colitits X” på slutet av 1970-talet, är ett syndrom som drabbar hästar och många gånger är utgången fatal. Syftet med denna litteraturstudie är att redogöra för etiologin, epidemiologin och patogenesen bakom intestinal clostridiosis. Värden av den komplexa koloniseringsresistensen och vilka riskfaktorer som är viktigast för sjukdomsutvecklingen kommer även att diskuteras.

Clostridiaceae är en bakteriefamilj bestående av anaeroba bakterier, ofta sporbildare. Arterna karaktäriseras av deras produktion av oerhört potenta toxiner med förmåga att framkalla sjukdom hos både däggdjur och fåglar. De identifierade etiologierna bakom intestinal clostridiosis är *Clostridium perfringens* och *Clostridium difficile*.

Symtomen vid intestinal clostridiosis är i det typiska fallet snabbt igångsättande av allvarliga diarréer och om hästarna inte behandlas går de en snabb död till mötes. Sjukdom orsakad av *C. difficile* har associerats till antibiotikabehandling och *C. perfringens*-orsakad intestinal clostridiosis har huvudsakligen uppmärksamats hos hästar som exponerats för olika typer av stresstillstånd. Det finns många riskfaktorer som verkar främja uppkomsten av intestinal clostridiosis. Antibiotikabehandling, svält och hospitalisering är exempel på faktorer som kan föregå tillväxt av clostridier i tarmkanalen.

Behandlingen består av understödjande terapi men antibiotikabehandling, fekal transplantation och administrering av olika typer av probiotika kan mildra symtomen.

Slutsatserna som kan dras efter litteraturgenomgången är att de patogener som ligger bakom intestinal clostridiosis hos vuxna hästar är *C. perfringens* typ A och *C. difficile*. Dessa bakterier kan finnas i hästarnas tarm i icke detekterbara mängder även hos friska hästar och sjukdom uppstår när den gastro-intestinala mikrofloran störs så mycket att koloniseringsresistensen inte kan förhindra tillväxt av de patogena clostridierna. Efter toxinproduktion inträder allvarlig sjukdom.

Den kliniska bilden är ospecifik och svår att skilja från eventuella differentialdiagnoser. På grund av detta ska alltid provtagning för bakteriologisk odling och typning genomföras. Det är väldigt viktigt att odla för både *C. perfringens* och *C. difficile* vid misstanke eftersom de odlas fram med selektiva metoder som är specifika för de två olika bakterierna. Risken är att man missar den ena arten om man väljer att endast odla för den andra.

Koloniseringsresistensen är antagligen viktigare än vad vi vet med hänsyn till att förebygga och förhindra uppkomsten av intestinal clostridiosis hos hästar. Tyvärr är för lite forskning gjord inom detta område och några klara slutsatser om den gastro-intestinala mikroflorans roll och värde i skyddet mot clostridierna går inte att dra i dagsläget.

SUMMARY

Intestinal clostridiosis is a syndrome that was broken out from the concept of "colitis X" in the late 1970s. It is a syndrome that affects horses and the outcome is many times fatal. The purpose of this review is to explain the aetiology, epidemiology and pathogenesis of intestinal clostridiosis. Further more the value of the complex colonising-resistance and the main risk factors for developing disease will be illuminated and discussed.

Clostridiaceae is a family of anaerobe bacteria, most of them able to form spores. The species are characterized by their production of very potent toxins and ability to induce sickness in both mammals and birds. The identified aetiologies behind intestinal clostridiosis are *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile*

The clinical picture of intestinal clostridiosis is in the typical case a rapid up come of severe diarrhoeas and if the horses do not get appropriate treatment they go quick demise. Infection with *C. difficile* has been associated to treatment with antibiotics and *C. perfringens* infection has mainly been observed in horses exposed for different states of stresses.

There are many risk factors that seem to promote the appearance of intestinal clostridiosis. Treatment with antibiotics, starvation and hospitalization is a few examples of states that can precede proliferation of clostridia in the intestines.

The treatment consists of supportive therapy but antibiotics, faecal transplantation and administration of probiotics may also alleviate the symptoms.

From the literature the following conclusions can be drawn. The aetiologies of intestinal clostridiosis in adult horses are *C. perfringens* type A and *C. difficile*. These bacteria may have colonised the intestine in undetectable small numbers in healthy horses and sickness will not occur until the gastro-intestinal micro flora gets disrupted so that the colonising resistance is not able to prohibit proliferation of the pathogenic clostridia. Following production of toxins severe acute sickness is developed.

The clinical picture is often unspecific and difficult to distinguish from differential diagnosis. Because of this, sampling for bacteriological culture and typing should always be done. It is very important to culture for both *C. perfringens* and *C. difficile* when intestinal clostridiosis is suspected since they are grown on selective medias. The risk is that you will miss one species if you choose to only culture one of them.

The colonising resistance is probably more important than we know when it comes to prevention and prohibition of intestinal clostridiosis in adult horses. Unfortunately too little research is made in this area and any clear conclusions about the normal gastro-intestinal micro flora's role in the protection of clostridial infection cannot be drawn in the current situation.

INLEDNING

Släktet *Clostridium* omfattar bakteriearter som är grampositiva, stora och stavformade. De är syretoleranta till strikt anaeroba och har förmågan att bilda resistent sporer i för bakterien ogynnsamma miljöer. De flesta är rörliga med en peritrichös flagell (Quinn et al., 2001; Hatheway, 1990)

Bakterierna framkallar allvarlig sjukdom hos både däggdjur och fåglar. Den gemensamma och viktigaste sjukdomsframkallande egenskapen hos de flesta clostridier är att de producerar oerhört potenta toxiner. De olika toxinerernas verkningsmekanismer gör det möjligt att dela in arterna i tre olika subgrupper: histotoxiska-, neurotoxiska- och enterotoxiska clostridier (Quinn et al., 2001).

Begreppet intestinal clostridiosis formulerades av Wierup (1977) och detta specifika syndrom kommer beskrivas i detta arbete som baseras på en genomgång av litteraturen. Problematiken kring uppkomsten av intestinal clostridiosis är komplicerad och beroende av många riskfaktorer. Sjukdomen har ofta ett dödligt förlopp. Förloppet från infektion till akut sjukdom och eventuell död är ofta snabbt, dessutom är sjukdomen svårbehandlad. Den utforskade patogenesen och svåra diagnostiken gör många gånger att ingen diagnos ställs på hästar som insjuknat och utvecklat diarréer av varierande karaktär.

Syftet med denna artikel är att redogöra för etiologin, epidemiologin och belysa patogenesen bakom intestinal clostridiosis hos vuxna hästar, sjukdomens riskfaktorer och behandling. Vidare kommer jag diskutera vikten av den så kallade koloniseringsresistensen.

MATERIAL OCH METODER

Denna litteraturstudie baseras huvudsakligen på vetenskapliga artiklar. Artiklarna har hämtats från databaserna PRIMO, CAB och PubMed. Sökord som använts enskilt och i kombination är: *Clostridium*, *C. difficile*, *difficile*, *Clostridium perfringens*, *perfringens*, horses, equin*, clostridiosis, clostridial colitis, pathogen, vaccine. I de flesta söken avgränsades sökningen till veterinärmedicin. Från uppsökta artiklar användes ett antal referensartiklar. Utöver artiklarna har jag använt mig av Sveriges veterinärmedicinska anstalts och Vetbacts hemsidor och referenslitteratur till veterinärprogrammet vid Sveriges Lantbruksuniversitet.

Artiklarna och de övriga källorna granskades kritiskt med hänsyn till studieform, trovärdighet och relevans för detta specifika arbete. Därefter har relevanta delar plockats ut och sammanfogats i detta arbete.

HISTORIK

Redan på 1960-talet infördes begreppet "Colitis X" för en perakut till akut hemorragisk enterokolit som många gånger var fatal för drabbade hästar. I Sverige uppmärksammades detta syndrom först på framstående löptävlingshästar som väldigt snabbt blev allvarligt sjuka med kraftiga diarréer och som kort efter symtomen uppkommit dog (Wierup, 1977). Etiologin var då okänd, därav termen X. Ett decennium senare kunde ett sjukdomssyndrom hos hästar

med akut enterokolit som då skulle diagnostiseras som Colitis X, associeras till ett högt antal *Clostridium perfringens* typ A (*C. perfringens* typ A) i tarminnehållet (Wierup, 1977). I Wierups avhandling föreslogs namnet ”Ekvin Intestinal Clostridios” på detta nya syndrom troligen orsakat av *C. perfringens* typ A. Detta begrepp skulle brytas ut från den ospecifika beteckningen colitis X som troligen även kunde omfatta andra då okända etiologier.

På senare tid har ytterligare en bakterie associerats till intestinal clostridios hos häst, nämligen *Clostridium difficile* (*C. difficile*) (Båverud et al., 1997; Weese et al., 2001; Songer et al., 2004; Feary et al., 2006).

CLOSTRIDIUM

Som ovan nämnt är bakterier inom släktet *Clostridium* sporbildare och karaktäriseras av produktion av potenta och i många fall potentiellt letala toxiner. Nedan följer en kortare beskrivning av de tre olika subgrupperna av clostridier, de histotoxiska, neurotoxiska och enterotoxiska.

De viktigaste histotoxiska clostridiumarterna är *C. septicum*, *C. novyi*, *C. chauvoei*, *C. sordellii*, *C. piliforme* och *C. perfringens*. För alla dessa arter är det olika histotoxin som framkallar sjukdom hos olika djurslag inklusive häst. Bakterierna, som kan finnas i jorden eller tarmkanalen, infekterar via sår, tillväxer och angriper sedan de olika organsystemen. Ödematösa, nekrotiska och hemorragiska förändringar uppstår. Infektion leder ofta till en snabb död, vilket gör dem extra allvarliga (Quinn et al., 2001).

Föl infekterade med den histotoxiska *C. perfringens* typ C uppvisar ofta hemorragiska diarréer och sepsis. Vid typ C infektion lider fölen först av akuta abdominala smärtor som följs av explosiva diarréer. Neonatala föl är kanske den största riskgruppen av föl som utvecklar *C. perfringens* typ C-clostridios (Diab et al., 2011; Uzal et al., 2012). Föl infekterade med *C. perfringens* typ C faller dock inte in under begreppet intestinal clostridios även om symtomen överensstämmer, utan här rör det sig om en specifik sjukdom som endast angriper föl. En liknande känd sjukdom är spädgrisdiarré, också den orsakad av *C. perfringens* typ C (Sveriges veterinärmedicinska anstalt).

Inom de neurotoxiska clostridierna finns två arter, *Clostridium botulinum* (*C. botulinum*) och *Clostridium tetani* (*C. tetani*). *C. botulinum* producerar extremt potenta toxiner. Intoxikation genom intag av preformerat *C. botulinum* neurotoxin i exempelvis foder är den vanligaste smittvägen vid botulism hos hästar. Intoxikationen resulterar i en slapp paralys genom att toxinet blockerar frisläppningen av acetylkolin från motorändplattan i nervsynapsen. Till slut angrips andningsmuskulaturen vilket är fatalt (Sveriges veterinärmedicinska anstalt)

Till skillnad från *C. botulinum* orsakar *C. tetani* en spasmisk paralys, en sjukdom kallad stelkramp. Infektionen sker oftast genom att sporer eller celler tar sig in i sår. Tillväxt och toxinproduktion blir sedan möjlig i en anaerob miljö. Två kända toxiner, tetanolysin och tetanospasmin, varav de senare orsakar de neurala symtomen. Precis som vid botulism är

mortaliteten hög. De flesta av våra hästar är vaccinerade mot stelkramp vilket effektivt förebygger sjukdomen (Sveriges veterinärmedicinska anstalt).

I detta arbete kommer fokus riktas mot de enterotoxiska clostridiumarter, *C. difficile* och *C. perfringens* som i samband med en ökad förekomst i tarmkanalen kan orsaka en akut och allvarlig sjukdom hos häst som i den vetenskapliga litteraturen nu ofta gemensamt betecknas som Intestinal Clostridiosis (Quinn et al., 2001).

ETIOLOGI

C. perfringens är en orörlig stav (Hatheway, 2009). Bakterien delas in i fem olika typer, A-E, baserat på hur dess toxinproduktion av alpha (CPA), beta (CPB), epsilon (ETX) och iota (ITX) toxiner ser ut. Toxinernas aktivitet visas i tabell 1. Enterotoxin (CPE) och beta-2-toxin (CPB2) är ytterligare två toxiner som produceras av alla typer av *C. perfringens*, men dessa används inte i klassificeringen (Diab et al., 2011). Enligt Songer et al. (2011) är det framförallt typ A och C som orsakar sjukdom hos hästar men även typ B kan associeras med hemorragisk enterit hos föl. Diab et al. (2011) menar på att det huvudsakligen är typ C som är etiologin bakom ekvin enterokolit, men att typ A och C möjligtvis skulle kunna orsaka sjukdom synergistiskt.

C. perfringens typ A producerar huvudsakligen alfa-toxin som i tarmen orsakar nekros i tarmvillus. *C. perfringens* typ C producerar däremot både alfa- och beta-toxin. Mängden beta-toxin bestämmer patogeniciteten hos stammen (Smith, 2009).

Tabell 1. Toxiner producerade av *C. perfringens* och deras huvudsakliga aktivitet (Songer et al., 2004)

Toxin	Aktivitet
α	Fosfolipas, verkar på fosfolipider i cellmembraner → cellysering. Resulterar i hemolys, nekros och letalitet. Produceras av alla typer.
β	Nekrotiserar slemhinnor, CNS-symtom, ökat blodtryck och ökad hjärtfrekvens. Dermonekrotiskt och letalt.
ϵ	Aktiveras av proteaser, främjar upptag i cirkulationen, ger ökad kärlpermeabilitet → perivaskulära ödem och blödningar. Påverkar CNS och kan orsaka encephalomalaci, är nekrotiserande och potentiellt letalt.
ι	Dermonekrotiskt, letalt.

C. difficile uppmärksammades senare i samband med sjukdomsfall när de två då nya antibiotikumen vancomycin och clindamycin introduceras inom humanmedicinen på 1980-talet. Bakteriens viktigaste virulensfaktor är att den producerar toxiner, men egenskaper som pili, kapsel och nedbrytande enzymer bidrar också till virulensen. Toxin A (TcdA) och toxin B (TcdB) är de huvudsakliga toxinerna. Toxin A är ett enterotoxin som orsakar vätskeackumulering i tarmen. Toxin B är ett cytotoxin som orsakar celldöd genom att bryta sönder cytoskelettet (Songer et al., 2004).

KLINISK BILD

De kliniska symtomen vid intestinal clostridiosis hos vuxna hästar kännetecknas i det typiska fallet av snabbt igångsättande av illaluktande, vattniga till hemorragiska diarréer, nedsatt allmäntillstånd och om obehandlad en snabb död (Wierup, 1977). Som tidigare nämnts finns det i dagsläget två etiologiska agens som orsakar intestinal clostridiosis, *C. difficile* och *C. perfringens*.

C. perfringens typ A infektion hos adulta hästar yttrar sig som allvarlig sjukdom med illaluktande diarréer och en plötslig död (Wierup, 1977). Precis som vid *C. difficile*-orsakad clostridiosis blir hästarna uttorkade, svaga och anemiska. Mortaliteten är hög. Även om det är ovanligt kan djuren dö akut utan att först ha utvecklat diarréer. Tarmarna kan svullna på grund av gasbildning och ackumulering av vätska i tarmlumen (Smith, 2009).

Kliniska symtom vid infektion av *C. difficile* är både variabla och ospecifika. De kan vara allt från milda diarréer till nekrotiserande hemorragisk enterit (Weese et al., 2001). Ytterligare tecken är kolik, anorexi, toxemi, pyrexia, leukopeni, vattniga diarréer och uttorkning (Weese et al., 2001; Songer et al., 2004).

EPIDEMIOLOGI

De enterotoxiska clostridiebakterierna förekommer normalt både i tarmkanalen och i djurens miljö, främst i jorden (Songer et al., 2004). I Wierups (1977) avhandling fann han att friska hästar i 90 % av fallen var bärare av < 5 colony forming units (CFU) av *C. perfringens* per gram faeces. Detta kan jämföras med antalet *C. perfringens* som isolerades från de sjuka hästarna. Här kunde man påvisa upp till 10⁷ CFU per gram faeces (Wierup, 1977).

Båverud fann att det till skillnad från *C. perfringens* inte verkade som *C. difficile* förekommer överhuvudtaget i tarmen hos friska adulta hästar (Båverud et al., 2003). Däremot så indikerades i samma studie att friska föl, upp till 30 dagars ålder, hade en relativt hög prevalens av asymtomatiska bärare, 33 – 55 %. Prevalensen hos friska föl med en ålder mellan 30 dygn – 6 månader var lika med noll (Båverud et al., 2003).

Hästarna exponeras initialt för de aktuella clostridierna från jorden och miljön och bakterierna koloniserar sedan i varierande omfattning hästarnas tarmkanal. *C. perfringens* typ A verkar i större omfattning utveckla sjukdom hos högt påfrestade individer, som i fallen Wierup beskriver (1977) och i *C. difficile*-fallet har en stark association till antibiotikabehandling visats (Båverud et al., 1997; Arroyo et al., 2004).

DIAGNOSTIK

En preliminär diagnos av intestinal clostridiosis baseras på klinisk bild, sjukdomsanamnes, patologiska fynd och jämförelse mot troliga differentialdiagnoser (Smith, 2009). I den kliniska bilden och anamnesen ska kliniska symtom, sjukdomar som kan orsaka stress,

pågående eller tidigare administrering av antibiotika och hospitalisering särskilt beaktas (Diab et al., 2013). Hästar med nekrotiserande enterit vid obduktion ska misstänkas ha infekterats med *C. difficile* (Keel et al., 2006). Histologiska prover av den intestinala mucosan och submucosan ska visa en nekrotiserande enterit med utbredda tromboser (Diab et al., 2013). Eftersom de kliniska symtomen och histologiska fynden inte är patognoma måste mikrobiologiska prover användas för att verifiera den preliminära diagnosen (Diab et al., 2013).

Faecesprov bör tas direkt från rectum och paketeras i plastpåsar där luften elimineras så snabbt och fullständigt som möjligt (Båverud, 2004). Det är extra viktigt att utföra sina tester relativt snabbt efter provtagning. Bakteriologisk odling av *C. perfringens* från faecesprov beskrivs ingående i Wierups avhandling (Wierup, 1977). För att inte bara påvisa utan också kunna mängd-bestämma förekomsten utfördes odling från olika spädningar av faeces. Selektiva medier och anaerob inkubation är några av de redovisade momenten. Karaktäristiska framodlade kolonier typas med avseende på toxinproduktion av CPA, CPB och ETX med hjälp av ELISA-tester (Diab et al., 2013).

På liknande sätt diagnostiseras *C. difficile*-orsakad intestinal clostridiosis. Odling sker på selektiv cycloserin-cefoxitin-fruktos agar som inkuberas i anaerob kammare i 48 timmar efter inokulering. Kolonier med karaktäristiskt utseende, gramfärgning och som ger färgförändring misstänks vara *C. difficile*. Verifiering av kolonierna utförs genom att kontrollera produktion av L-prolin-aminopeptidas. Närvaro av toxin A och B testas med ELISA (Weese et al., 2000; Smith, 2009). PCR kan användas för att detektera generna av toxin A och B, men även om generna är närvarande ger testet ingen information om hur dem är uttryckta i den isolerade stammen (Båverud, 2004; Smith, 2009).

Prov av cytotoxiska effekter sker på cellplattor. Plattorna inokuleras med bakterier och kontrolleras 24 timmar senare med avseende på cytopatogena effekter. Enligt Silva ansågs provet vara positivt om minst 90 % av cellerna var rundade, närmre beskrivning av metoden redovisas i Silva et al. (2013).

Som nämnt ovan är en av svårigheterna att proverna måste förvaras i en anaerob miljö i så stor utsträckning som möjligt, risken att få falska-negativa svar ökar med tiden de utsätts för en aerob miljö (Smith, 2009). Om provet förvaras i en aerob miljö kunde 76 % av proverna framodlas efter 24 timmar, 67 % efter 48 timmar och bara 29 % efter 72 timmar. Antalet sjunker alltså drastiskt med tiden i aerob miljö. I anaerob miljö däremot kunde 96 % fortfarande odlas fram efter 30 dagar (Weese et al., 2000).

Ytterligare en svårighet är att bestämma hur provsvaren ska tolkas när provsvaren inte är positiva för både cytotoxin och odling. För *C. difficile* har man sett att cellodlingsprovet har varit positivt och att cytotoxintestet varit negativt vid den första provtagningen. Cytotoxintestet visade inte positivt förrän på prov tagna ett par dagar senare. Därför bör man ta prover flera dagar i rad (Båverud et al., 1997).

Differentialdiagnoser

Akut sjuka hästar med diarréer kan misstänkas för infektion med *Salmonella* utöver *C. perfringens* och *C. difficile* (Smith, 2009).

Ekvin monocytär ehrlichios, eller Potomac feber som den också kallas är en bakterieinfektion av *Neorickettsia risticii* som sprids med flugor. Diarré och nedsatt allmäntillstånd är två symtom som uppvisas hos insjuknade hästar. Dessutom är dödligheten relativt hög. Denna diagnos bör därför differentieras från intestinal clostridiosis, dock så är den ännu inte påvisad i Sverige (Sveriges veterinärmedicinska anstalt).

PATOGENES

Både *C. difficile* och *C. perfringens* kan ha en fekal-oral smittväg. Hästen infekteras då genom intag av vegetativa bakterier eller sporer som finns i jorden eller i miljön som kontaminerats av andra infekterade hästar eller människor (Båverud, 2004; Smith, 2009).

Men, eftersom *C. perfringens* och förmodligen även *C. difficile* kan finnas i en liten mängd, utan att orsaka sjukdom, i hästarnas tarmkanal är det förslagsvis bättre att ange att hästarna exponeras efter födseln och bakterierna därefter koloniserar tarmkanalen. Sjukdom kan då uppstå till följd av att bakterierna ges tillfälle att proliferera i mag-tarmkanalen hos asymtomatiska bärare. Tillväxten i tarmen kan ha förbigåtts av att hästen blivit utsatt för stress och/eller antibiotikabehandling. Dessa tillstånd kan störa den normala tarmfloras balans (eubakterios) som leder till en obalans (dysbakterios). Det är obalansen som möjliggör tillväxten av de här aktuella clostridiumarterna. I normala fall utgör mikrofloran ett skydd mot tillväxt av opportunistiska bakterier genom att konkurrera om plats och näring (Båverud, 2004). Denna förklaring bedöms idag vara den centrala i sjukdomens patogenes.

Båverud (1998) beskriver akut kolit hos ston vars föl har blivit behandlade för *R. equi* pneumoni med makroliderna erythromycin och rifampicin. I detta fall trodde man att stona av misstag intagit små rester av antibiotika när de varit i kontakt med det behandlade fölet, att den gastro-intestinala mikrofloran stördes och en *C. difficile*-infektion uppstod.

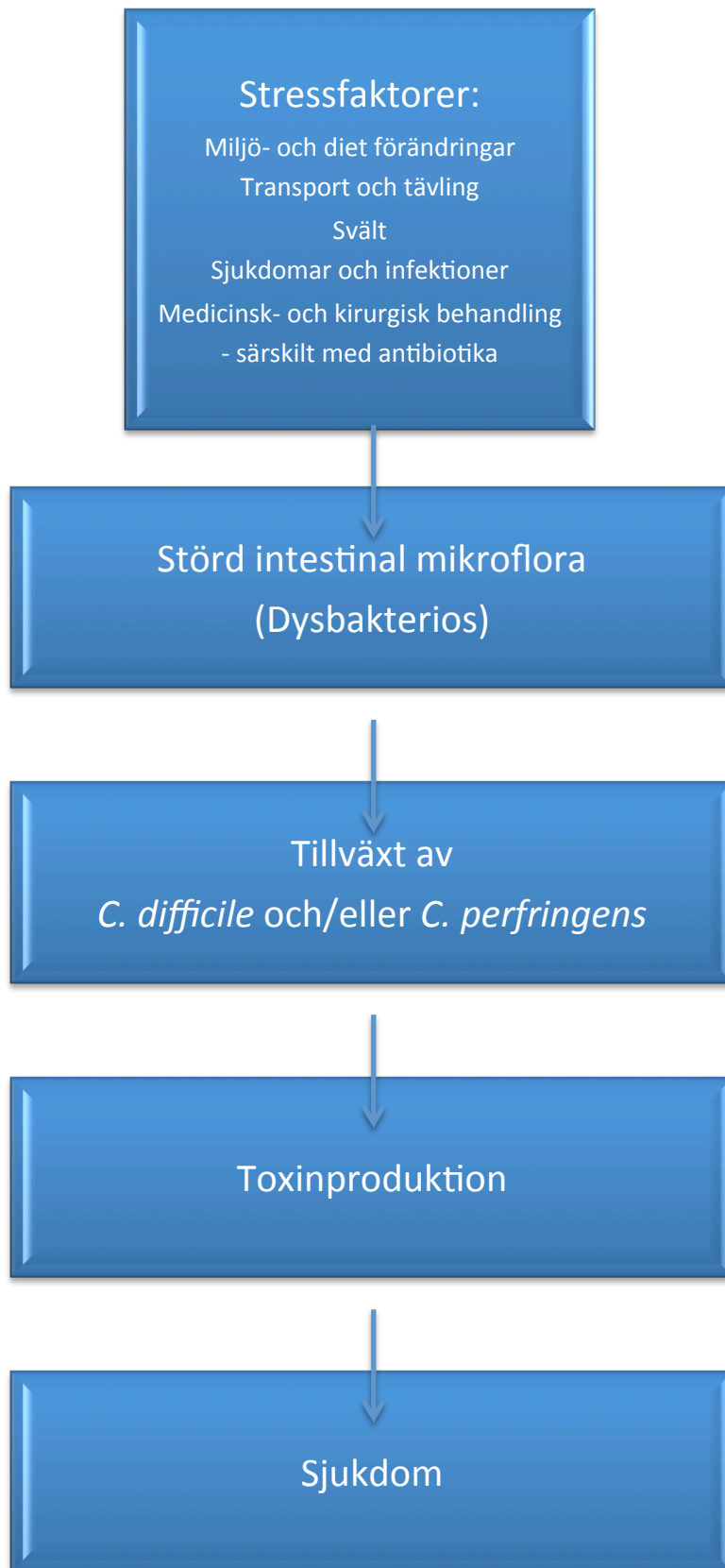
Bakteriernas produktion av potenta toxiner leder till sjukdomsutveckling. I en studie av Nusrat et al, (2001), påvisas att *C. difficile*s toxin A och B verkar symbiotiskt i magtarmkanalen genom att:

- Öka den paracellulära permeabiliteten
- Disrupturera F-aktin arkitekturen
- Demontera och modulera tight-junctions

De ovan nämnda biomolekylära effekterna yttrar sig i vätskeackumulering, inflammation och skador på mucosan i tarmen (Barbut et al., 2001).

C. perfringens typ A producerar enterotoxin i samband med att sporulering sker. Toxinet frisätts sedan när den vegetativa cellen lyseras. Toxinet verkar genom att förändra permeabiliteten, inhibera syntes av makromolekyler och upplösning av cytoskelettet vilket alla tre bidrar till att cellerna lyseras (Songer et al., 2004).

Patogenesen vid intestinal clostridios orsakad av *C. difficile* och *C. perfringens* är illustrerad överskådligt i figur 1.



Figur 1. Patogenes vid Intestinal clostridiosis orsakad av *C. perfringens* och *C. difficile* (Modifierad från Båverud, 2004).

RISIKFAKTORER

Som presenterat i figur 1, finns det många faktorer som påverkar uppkomsten av *C. difficile*- och *C. perfringens*-orsakad sjukdom. Stresstillstånd och behandling med antimikrobiella preparat är de två huvudsakliga riskfaktorerna. Det specifika diarréstillståndet som uppstår till följd av antibiotikabehandling benämns antibiotika-associerad diarré och förkortas härefter till AAD.

Barr et al. (2012), visade i sin studie att användning av alla klasser av antibiotika ökar risken för AAD, medan andra snarare menar att med de studier som finns tillgängliga kan ingen antibiotika-klass uteslutas (Costa et al., 2012). Risken ökar vid de tillfällen flera klasser av antibiotikum används kombinerat. Den vanligaste etiologin för AAD är *C. difficile*, men det kan också uppstå på grund av *C. perfringens* eller *Salmonella* (Barr et al., 2012). I en prevalensundersökning av vuxna hästar med AAD fann man att 42 % av hästarna var positiva för *C. difficile*. Intestinal clostridiosis kan därför starkt associeras med antibiotikabehandling (Båverud et al., 2003).

I en annan studie från Båverud et al. (1997), menade författarna att utöver antibiotikabehandling är riskfaktorer för utveckling av *C. difficile*-orsakad intestinal clostridiosis olika typer av stress, som transport, hospitalisering, pre- och postoperativ svält, gastro-intestinal- eller övrig kirurgi och medicinsk behandling. Att inte utfodra hästarna med grovfoder är också en riskfaktor (Jones, 2000).

I flera studier pekar man på att hospitalisering är en av de större riskfaktorerna för utveckling av intestinal clostridiosis (Båverud et al., 1998; Weese et al., 2000). Förutom att hospitaliserade hästar vanligen lider av någon sjukdom exponeras även hästarna för stress genom att komma till en för hästen helt ny miljö och i många fall genomgå transport, foderbyte och medicinsk behandling med eller utan antibiotika. Dessutom ökar exponeringen av clostridiumbakterier och sporer, då prevalensstudier visar en högre förekomst på djursjukhus jämfört med andra utemiljöer där hästarna kan tänkas vistas (Weese et al., 2000; Båverud et al., 2003). Sporer i hästarnas miljö är en riskfaktor. Eftersom sporer är väldigt resistenta kan de persistera i miljön upp till år. Noggrann mekanisk och kemisk rengöring med verksamma substanser av hästarnas miljö är väldigt viktigt (Båverud et al., 2004). Klor är ett exempel på desinficeringsmedel som är effektivt mot sporer (Smith, 2009).

För att förstå hur olika stresstillstånd som hästarna exponeras för kan orsaka dysbakterios som främjar uppkomsten av en bakteriell enterokolit krävs att man har förståelse för hur hästens intestinala mikroflora är uppbyggd och fungerar. Hästar till skillnad från idisslarna använder cecum och colon till att fermentera foder. Så mycket som 65 % av den totala foder till energiomvandlingen sker av fermenterande bakterier i grovtarmen. En frisk och välfungerande mikroflora är alltså essentiell för att hästen ska må bra (Costa et al., 2012). Mikrofloran utgör dessutom en så kallad koloniseringsresistens. Det innebär att opportunistiska patogena bakterier har det svårt eller direkt hindras från att tillväxa i en miljö där det normala bakteriesamhället är intakt (Båverud et al., 1997).

Den ekvina mikrofloran är ett komplext samhälle vars roll i gastro-intestinal sjukdom är både svårutredd och dåligt förstådd. Det flera författare är överens om är att stresstillstånd kan disrupturera hästarnas intestinala mikroflora så pass att i detta fall de enterotoxiska clostridiumarterna (*C. perfringens* och *C. difficile*) får möjlighet att tillväxa, kolonisera och infektera tarmen (Båverud et al., 1997).

BEHANDLING

Hästar insjuknade i intestinal clostridiosis ges ofta en understödjande behandling (Smith, 2009). Denna består huvudsakligen av vätska och elektrolytersättare, antidiarrétiska agenter och Non steroid anti-inflammatory drugs (NSAIDs). Andra behandlingar som probiotika, fekal transplantation och yoghurt med levande bakteriekultur kan administreras för att främja den normala intestinala mikrofloran (Desrochers et al., 2005). I Sverige har även filmjolk använts framgångsrikt i behandlingen mot intestinal clostridiosis (Wierup, 1977).

En icke patogen jäst, *Saccharomyces boulardii*, har visat sig vara effektiv i både preventiv och terapeutisk behandling vid diarré på människor. Den bakomliggande verkningsmekanismen är dels frisläppandet av en proteas från *S. boulardii* som har förmåga att bryta ner *C. difficile*s toxin A och B. Andra mekanismer som föreslagits ligga bakom den skyddande egenskapen, vid andra etiologier än *C. difficile*, är att sekretion av immunglobuliner till tarmen främjas och att det retikuloendoteliala- och komplementsystemet aktiveras (Desrochers et al., 2005).

Är den understödjande behandlingen överksam är det ibland oundvikligt med antibiotikabehandling. För *C. difficile* orsakad intestinal sjukdom beror valet av antibiotikum på känsligheten hos dels bakteriestammen av *C. difficile* och dels den övriga gastro-intestinala floran. I en studie av Weese visade sig alla stammar vara känsliga för metronidazol och vancomycin (Weese et al., 2001). I samma studie menar författarna också att metronidazol bör vara förstahandsvalet vid behandling, mycket på grund av att de är oroliga för att vancomycin-resistenta bakterier ska utvecklas. Dock så kan vancomycin användas när en metronidazol-resistens har påvisats och när endast understödjande behandling inte varit effektiv.

DISKUSSION

Intestinal clostridiosis är ett sjukdomssyndrom där relativt mycket forskning har gjorts sedan det först uppmärksammades på slutet av 1960-talet. En etiologisk bakgrund har blivit två under årens gång och den komplexa patogenesen har någorlunda utretts. I dagsläget visar forskning att *C. perfringens* typ A och *C. difficile*, kan orsaka intestinal clostridiosis hos vuxna hästar. Det är få som har undersökt möjligheten att både *C. perfringens* och *C. difficile* ko-infekterar hästarnas tarm och på så sätt ger upphov till samma symtombild. En liten studie från Uzal, där obduktion av fem föl, med en klinisk bild av intestinal clostridiosis, undersökte förekomsten av både *C. perfringens* och *C. difficile*. Resultatet visade på en potentiell synergism mellan *C. perfringens* och *C. difficile*. Infektion av den ena bakterie kan ha predisponerat för den andra eller vice versa (Uzal et al., 2011). Men studien var liten och det

behövs definitivt mer forskning som undersöker de två bakteriernas samspel i sjukdomsförloppet.

På senare tid har diskussionen om ytterligare orsakande bakterietyper föreslagit och i princip även fastställt beta-2-toxigena *Clostridium perfringens* som etiologiskt agens till intestinal clostridiosis hos hästar. I en studie av Feary et al. (2006) verkade β_2 -toxigena *C. perfringens* kunna orsaka enterokolit hos häst. Samma typ kunde också påvisas hos 75 % av hästarna som hade typisk eller atypisk typhlokolit i en studie av Herholz et al. (1999). Det är nog dessutom möjligt att fler typer eller bakterier kan komma att associeras med syndromet, vilket helt plötsligt gör det till ett ganska brett sjukdomsbegrepp med hänsyn till vad som kan orsaka det.

Den kliniska bilden för intestinal clostridiosis kan vara ospecifik vilket gör den svår att skilja från andra enteriska sjukdomar. Jag tror snarare på att använda epidemiologin genom att kolla vilka hästar som insjuknat. Detta ger en bättre fingervisning om dels att det är intestinal clostridiosis det rör sig om, dels vilket agens i clostridiosis-komplexet som kan ha orsakat fallen (Wierup, 1977; Båverud et al., 1997; Arroyo et al., 2004; Diab et al., 2011; Uzal et al., 2012). Däremot så tror jag tyvärr inte mer än att det är just en fingervisning, och provtagning bör därför göras selektivt med avseende på både *C. perfringens* och *C. difficile*. Isolat av *C. perfringens* bör också PCR- testas med avseende på beta-2-toxin (Smith, 2009).

Sker odling endast för den ena bakterien finns risken att den andra arten inte kommer detekteras. I ett sådant fall kommer ingen exakt diagnos att ställas. Att verifiera diagnosen genom att påvisa ett agens vid dessa typer av infektioner är något som veterinärkåren verkligen borde jobba för. Ett steg på vägen anser jag vara att meta-analysera prover i så stor utsträckning som det bara går eller i alla fall odla för både *C. perfringens* och *C. difficile*. Att fastställa ett agens är inte bara positivt för den enskilde individen utan gynnar ju självklart även forskningen. Det är viktigt att inte glömma att orsaken kan vara Salmonella även om detta är ovanligt för hästar som är uppfödda och lever i Sverige.

En väldigt viktig faktor i patogenesen för båda bakterieinfektionerna, som dessutom de flesta författare är eniga om, är att en stress av den intestinala mikrofloran behövs för att clostridierna ska få övertaget i tarmen och därefter framkalla sjukdom. Det är allmänt vedertaget att hästar är extremt känsliga när deras intestinala mikroflora rubbas och veterinära försiktigheter tas ju faktiskt till i till exempel val av antibiotika och andra läkemedel. Antibiotikabehandling, transporter, miljöombyte, medicinering, svält, dräktighet, foderbyte är alla flera olika tillfällen och tillstånd som har förmåga att påverka hästarna så att mikrofloran störs. Jag tycker dessa olika stresstillfällen kan delas in i två grupper; en som orsakar direkt stress av mikrofloran och en annan som mer indirekt har en effekt på den. Till exempel så hamnar antibiotikabehandling och svält inom gruppen direkt påverkan medan miljöombyte och transporter skulle falla inom ramen för en indirekt påverkan på mikrofloran. De indirekta innebär för mig en extern stress på hästen som i sin tur yttrar sig bland annat genom en störd och mindre motståndskraftig tarmflora. Detta samband, hur stress kan påverka tarmkanalens viktiga mikroflora, är tyvärr väldigt dåligt klargjort och dessutom oerhört komplex att förstå och svårt att forska på. Frågor som hur ett stress-aktiverat

sympatiskt nervpåslag påverkar mikroflorans välmående och hur skillnaderna mellan kroniska och mer akuta stressmiljöer kan inverka på hästarna är bara ett par som jag tänker på och gärna skulle se mer forskning på. Jag tror att om vi någonsin kommer kunna förstå hela mikroflorans uppbyggnad, uppgift och komplexitet kommer vi ha möjlighet till att dels förebygga men också lättare kunna hjälpa hästar med alla typer av sjukdomar som på något sätt associeras med deras tarmsystem. Mikrofloran och koloniseringsresistensen är viktig, inte bara med avseende på en effektiv energiomvandling, men hur är som sagt väldigt oklart och mycket mer forskning krävs inom detta intressanta område.

I en studie från Båverud påvisades att 30 % av undersökta friska föl, yngre än 13 dygn, var positiva för *C. difficile* även då de inte behandlats med antibiotika. Detta tyder på att unga föl kan stå för en potentiell reservoar för *C. difficile* (Båverud et al., 2003). En intressant fråga är var bakterierna oftast kommer ifrån när hästar insjuknar. Är det vanligast att hästarna infekteras från sporer i omgivningen? Eller att de har dem i tarmkanalen i icke detekterbara antal och att tillväxt och sjukdomsutveckling sker efter stress av den intestinala mikrofloran? Svåra frågor att besvara, men det man kan sammanfatta från litteraturen är att vid feaces- eller tarminnehållsprov har *C. difficile* inte kunnat påvisas. Dock så kan man inte utesluta att hästar koloniserar av *C. difficile* i tarmen utan att vara sjuka. Testerna visar endast att bakterierna inte finns i de mängder som är testets minsta detekterbara antal och det kan därför inte förkastas att både *C. perfringens* och *C. difficile* finns mer eller mindre normalt förekommande i hästarnas tarm men att de hålls i schack genom koloniseringsresistensen.

Med en fastställd diagnos kan veterinär välja en behandling som har visat sig vara effektiv i det specifika fallet. Ett bra exempel är peroral administrering av *Saccharomyces boulardii* i behandlingen mot *C. difficile*-orsakad enterit. Behandlingen eliminerade inte bakterien, men minskade durationen av diarréerna och den gastro-intestinala sjukdomen generellt (Desrochers et al., 2005). Andra behandlingar som kan användas för att mildra diarréerna är administrering av filmjolk eller fekal transplantation. Dämpningen av sjukdomen kan förhoppningsvis göra att veterinären slipper ta till antibiotikabehandling, något som är att eftersträva för att undvika utveckling av resistens.

En intressant aspekt är om man genom vaccinering kan ge hästarna ett skydd mot de enterotoxiska clostridiumarterna. *Clostridium*-orsakade sjukdomarna stelkramp och botulism har båda effektiva vacciner som dessutom varit relativt lätta att utveckla och ta fram. Clostridios orsakad av *C. difficile* är den vanligaste nosokomiala infektionen på humansidan och där pågår också en hel del vaccinforskning (Barbut et al., 2001). Jag ser definitivt en stor fördel i att försöka utveckla ett vaccin som även skyddar hästarna mot infektion av *C. perfringens* och *C. difficile*. En kraftig infektion är, som flertalet gånger nämnt ovan, i de flesta fallen väldigt påfrestande för hästarna som blir allvarligt sjuka och många gånger dör. Hade man genom en enkel vaccination kunnat undvika detta hade vi sparat många hästar från onödigt lidande.

REFERENSER

- Arroyo, Luis G., Scott-Weese, J. & Staempfli, Henry R. (2004). *Experimental Clostridium difficile Enterocolitis in Foals*. Journal of Veterinary Internal Medicine, vol 18, ss. 734-738.
- Barbut, F. & Petit, J. C. (2001). *Epidemiology of Clostridium difficile-associated infections*. Clinical Microbiology and Infection, vol 7, ss. 405-410.
- Barr, B. S., Walldridge, B. M., Morresey P. R., Reed, S. M., Clark, C., Belgrave, R., Donecker, J. M. & Weigel, D. J. (2012). *Antimicrobial-associated diarrhoea in three equine referral practices*. Equine Veterinary Journal, vol 45, ss. 154-158.
- Båverud, V. (2004) *Clostridium difficile diarrhea: infection control in horses*. Veterinary Clinics of North America: Equine Practice, vol 20, ss. 615-630.
- Båverud, V., Franklin, A., Gunnarsson, A., Gustafsson, A. & Hellander-Edman, A. (1998). *Clostridium difficile associated with acute colitis in mares when their foals are treated with erythromycin and rifampicin for Rhodococcus equi pneumonia*. Equine Veterinary Journal, vol 30, ss. 482-488.
- Båverud, V., Gustafsson, A., Franklin, A., Aspán A. & Gunnarsson, A. (2003). *Clostridium difficile: prevalence in horses and environment, and antimicrobial susceptibility*. Equine Veterinary Journal, vol 35, ss. 465-471.
- Båverud, V., Gustafsson, A., Franklin, A., Lindholm, A. & Gunnarsson, A. (1997). *Clostridium difficile associated with acute colitis in mature horses treated with antibiotics*. Equine Veterinary Journal, vol 29, ss 279-284.
- Costa, M. C. & Weese, J. S. (2012). *The equine intestinal microbiome*. Animal Health Research Reviews, vol 13, ss. 121-128.
- Desrochers, A. M., Dolente, B. A., Roy, M., Boston, R. & Carlisle, S. (2005). *Efficacy of Saccharomyces boulardii for treatment of horses with acute enterocolitis*. Journal of American Veterinary Medical Association, vol 227, ss. 954-959.
- Diab, S. S., Kinde, H., Moore, J., Shahriar M. F., Odani, J., Anthenill, L., Songer, G. & Uzal F. A. (2012). *Pathology of Clostridium perfringens Type C Enterotoxemia in Horses*. Veterinary Pathology, vol 49, ss. 255-263.
- Diab, S. S., Rodriguez-Bertos, A. & Uzal, F. A. (2013). *Pathology and Diagnostic Criteria of Clostridium difficile Enteric Infection in Horses*. Veterinary Pathology, vol 50, ss. 1028-1036.
- Feary, Darien J. & Hassel, D. M. (2006). *Enteritis and Colitis in Horses*. Veterinary Clinics Equine Practice, vol 22, ss. 437-479.
- Hatheway, C. L. (2014-02-26). *Clostridium difficile*. <http://www.vetbact.org/vetbact/index.php?LANG=sv&artid=26&vbsearchstring=clos> [2014-03-19]
- Hatheway, C. L. (2014-02-26). *Clostridium perfringens*. <http://www.vetbact.org/vetbact/index.php?artid=29&vbsearchstring=clos> [2014-03-19]
- Herholz, C., Miserez, R., Nicolet, J., Frey, J., Popoff, M., Gibert, M., Gerber, H. & Straub, R. (1999). *Prevalence of β 2-Toxigenic Clostridium perfringens in Horses with Intestinal Disorders*. Journal of Clinical Microbiology, vol 37, ss. 358-361.
- Jones, R. L. (2000). *Clostridial enterocolitis*. The Veterinary clinics of North America. Equine practice, vol 16, ss. 471-485.

- Keel, M. K. & Songer, J. G. (2006). *The Comparative Pathology of Clostridium difficile-associated Disease*. Veterinary Pathology, vol 43, ss. 225-240.
- Netherwood, T., Binns, M., Townsend, H., Wood, J. L. N., Mumford, J. A. & Chanter, N. (1998). *The Clostridium perfringens enterotoxin from equine isolates; its characterization, sequence and role in foal diarrhoea*. Epidemiology & Infection, vol 120, ss. 193-200.
- Nusrat, A., von Eichel-Streiber, C., Turner, J. R., Verkade, P., Madara, J. L., & Parkos, C. A. (2001). *Clostridium difficile Toxins Disrupt Epithelial Barrier Function by Altering Membrane Microdomain Localization of Tight Junction Proteins*. Infection and Immunity, vol 69, ss. 1329-1336.
- Quinn, P. J., Markey, B. K., Carter, M. E., Donnelly, W. J. & Leonard, F. C. (2001). *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. 1. Ed. Oxford: Blackwell Science Ltd.
- Silva, R. O S., Ribeiro, M. G., Palhares, M. S., Borges, A. S., Maranhão, R. P. A., Silva, M. X., Lucas, T. M., Olivo, G. & Lobato, F. C. F. (2013). *Detection of A/B toxin and isolation of Clostridium difficile and Clostridium perfringens from foals*. Equine Veterinary Journal, vol 45, ss. 671-675.
- Smith, Bradford P. (2009). *Large Animal Internal Medicine*. 4 ed. St. Louis: Mosby Elsevier.
- Songer, J. Glenn & Post, Karen W. (2004). *Veterinary Microbiology, bacterial and fungal agents of animal disease*. 1. Ed. St. Louis: Elsevier Saunders.
- Statens veterinärmedicinska anstalt (2014-02-28). *Botulism-SVA*, <http://www.sva.se/sv/Djurhalsa1/Hast/Nervsjukdomar/Botulism/> [2014-03-13]
- Statens veterinärmedicinska anstalt (2014-02-28). *Stelkramp-SVA*, <http://www.sva.se/sv/Djurhalsa1/Hast/Infektionssjukdomar/Stelkramp/> [2014-03-13]
- Statens veterinärmedicinska anstalt (2014-02-28). *Botulism-SVA*, <http://www.sva.se/sv/Djurhalsa1/Hast/Infektionssjukdomar/Granulocytar-anaplasmos-hos-hast/> [2014-03-13]
- Statens veterinärmedicinska anstalt (2014-02-28). *Spädgrisdiarré-SVA*, <http://www.sva.se/sv/Djurhalsa1/Gris1/Tarmsjukdomar/Spadgrisdiarre-hos-gris/> [2014-03-13]
- Uzal, F. A., Diab, S. S., Blanchard, P., Moore, J., Anthenill, L., Shahriar, F., Garcia, J. P. & Songer J. G. (2012). *Clostridium perfringens type C and Clostridium difficile co-infection in foals*. Veterinary Microbiology, vol 156, ss. 395-402.
- Weese, J. S., Staempfli, H. R. & Prescott J. F. (2000). *Survival of Clostridium difficile and Its Toxins in Equine Feces: Implications for Diagnostic Test Selection and Interpretation*. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, vol, 12, ss. 332-336.
- Weese, J. S., Staempfli H. R. & Prescott, J. F. (2000). *Isolation of environmental Clostridium difficile from a veterinary teaching hospital*. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, vol 12, ss. 449-452.
- Weese, J. S., Staempfli, H. R. & Prescott, J. F. (2001). *A prospective study of the roles of Clostridium difficile and enterotoxigenic Clostridium perfringens in equine diarrhoea*. Equine Veterinary Journal, vol 33, ss. 403-409.
- Wierup, M. (1977). *Equine Intestinal Clostridiosis*. Acta Veterinaria Scandinavica, supplementum 62, ss.1-182.